1 月 January
2020, 63(1): 97 – 103

昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

http://www.insect.org.cn
doi: 10.16380/j.kcxb.2020.01.011

通用引物双重 PCR 在节肢动物物种鉴定中的应用

王彦坤[1], 李天楚[2], 粘景梓[1], 陈思聪[1], 郝志霞[1], 姜金壮[1], 黄大卫[1,2,*]

(1. 河北大学生命科学学院, 河北保定 071002; 2. 南开大学生命科学学院, 天津 300071)

摘要:【目的】本研究旨在使用基于线粒体基因通用引物的双重 PCR 技术同时扩增单一样本中两条标记基因,从而达到简化节肢动物物种鉴定流程的目的。【方法】在一次 PCR 实验中同时加入可扩增线粒体 COI 基因和 16S rDNA 两个不同分子标记的引物,对 3 纲 8 目 14 科的 14 种节肢动物物种标本的基因组 DNA 进行扩增;扩增产物经电泳和胶回收后测序,并 BLAST 在线搜索相似序列,验证基于通用引物的双重 PCR 在不同的动物类群中用于物种鉴定的有效性。【结果】应用基于 COI 和 16S rDNA 的引物从分属于 3 纲 8 目 14 科的 14 种节肢动物基因组 DNA 中均可成功扩增目的基因;扩增产物测序结果进一步证实了扩增的准确性。【结论】通过本方法进行物种的分子鉴定,不仅可以保证物种鉴定的高准确率,还可以明显减少时间与 DNA 样本量的消耗,这对需要快速准确鉴定物种或珍稀的材料样本十分重要。

关键词: 节肢动物; 物种鉴定; DNA 条形码; 线粒体基因; 双重 PCR; 通用引物

中图分类号: Q969　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 0454-6296(2020)01-0097-07

Application of duplex PCR with universal primers in arthropod species identification

WANG Yan-Kun[1], LI Tian-Chu[2], NIAN Jing-Zi[1], CHEN Si-Cong[1], HAO Zhi-Xia[1], JIANG Jin-Zhuang[1], HUANG Da-Wei[1,2,*] (1. College of Life Sciences, Hebei University, Baoding, Hebei 071002, China; 2. College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract:【Aim】The objective of this study is to amplify two marker genes in a single sample by duplex PCR with universal primers of mitochondrial genes, so as to simplify the process of arthropod species identification.【Methods】The primers that could amplify two different molecular markers including mitochondrial COI gene and 16S rDNA were added in a single PCR experiment, and the genomic DNA of specimens of 14 arthropod species belonging to 14 families of eight orders of three classes were amplified. The amplification products were sequenced after electrophoresis and gel extraction, and the similarity sequences were searched using BLAST online, to test the effectiveness of the universal primers based on duplex PCR method for species identification among different animal groups.【Results】The primers based on COI and 16S rDNA could amplify target genes from the genomic DNA of the 14 species belonging to 14 families of eight orders of three classes. The sequencing results of the amplified products further confirmed the accuracy of the amplification.【Conclusion】This method not only ensures the high accuracy of species identification, but also significantly reduces the consumption of time and DNA sample, which is very important for the rapid and accurate identification of species, especially for rare material samples.

Key words: Arthropod; species identification; DNA barcoding; mitochondrial gene; duplex PCR; universal primers

---

基金项目: 国家自然科学基金项目(31830084, 31672336, 31572313); 南开大学双一流建设基金(96172158, 96173250, 91822294)
作者简介: 王彦坤, 男, 1988 年 2 月生, 河北石家庄人, 博士研究生, 研究方向为 DNA 条形码, E-mail: yankunwang1988@126.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: huangdw@ioz.ac.cn
收稿日期 Received: 2019-11-03; 接受日期 Accepted: 2019-12-09

多重 PCR 是指在一次 PCR 反应体系中加入多对引物,从而同时产出多条目标片段的技术,由 Chamberlain 等(1988)首次提出。目前多重 PCR 主要应用于致病微生物的快速检测:如针对靶标致病微生物设计扩增产物大小不同的多对特异性引物,将这些引物同时用于对样品进行一次 PCR 扩增,然后将扩增产物进行电泳,即可通过检查扩增产物条带的大小快速确定样品中感染微生物的种类(Potrykus *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2015)。

自 Hebert 等(2003)引入 DNA 条形码的概念以来,BOLD 数据库中基于线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I(mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I, COI)基因的条形码超过 350 万条,覆盖超过 21 万个物种(截至 2019 年 10 月)(Ratnasingham and Hebert, 2007),成为动物物种鉴定的标准分子标签。在物种鉴定及进行系统发育研究中,单一的 DNA 条形码分析在一定程度上可以满足实验分析的需要,但在部分类群中,人们发现基于 COI 基因片段的 DNA 条形码会受到线粒体假基因(Song *et al.*, 2008)、线粒体异质性(Magnacca and Brown, 2010)或是胞内共生菌(Sun *et al.*, 2011; Xiao *et al.*, 2012)的影响。因此在物种鉴定以及系统发育研究中,为了获得更加准确可靠的结果,人们通常会选择多个分子标记,例如在线粒体 COI 基因序列的基础上,加测其他线粒体基因(沈媛等, 2010; Xiao *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2017)。在常规实验过程中,如果需要获取单一样本的多条标记基因,需要对该样品使用不同的引物进行多次扩增。因此,当需要快速准确鉴定物种,或是样本十分珍贵的情况下,上述实验过程由于实验流程显著延长或样本消耗加倍而存在诸多弊端。基于多重 PCR 的思路,在本研究中,我们考虑将双重 PCR 的方式用于多分子标记鉴定动物物种过程中的可能性,以期一次性获得单一样品的两个标记基因的序列,从而简化获取多个分子标记的实验过程,并减少样本消耗。

1 材料与方法

1.1 动物样本采集及基因组 DNA 提取

为了验证实验在不同类群中的实适用性,我们挑选了分属于 3 纲 8 目 14 科的 14 种动物(表 1),其中,家蝇 *Musca domestica* 与大型溞 *Daphnia magna* 由河北大学免疫学实验室饲养,黄粉虫 *Tenebrio molitor* 于 2014 年购自河北省保定市花鸟鱼虫市场并饲养,甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 于 2018 年 6 月购自河南济源白云实业有限公司,小金蝙蝠蛾 *Hepialus xiaojinensis* 于 2014 年 5 月采自四川省黑水县;其余标本均于 2018 年 6 月采自河北省保定市河北大学校园内,并依据形态将标本初步鉴定至科。所有标本采集后,浸泡于 100% 乙醇中,并在 -20℃ 中保存。

基因组 DNA 提取时,首先对标本的体表进行清洗,随后将整头标本(表 1 中标本编号 1, 11 和 13 的 3 种动物)或部分附肢(其余 11 种动物,长度约 5 mm),按照 *EasyPure* Genomic DNA Kit(北京全式金生物技术有限公司)说明书,提取基因组 DNA,并将其溶解于 200 μL Elution Buffer 中,随后将基因组 DNA 保存于 -20℃。基因组 DNA 提取质量通过扩增 COI 基因进行检验。

1.2 双重 PCR 及测序

常用于物种鉴定以及构建系统发育的线粒体基因包括 COI 基因, *Cytb* (cytochrome *b*)和 16S rDNA 等。基于 COI 基因的 DNA 条形码有数量非常庞大的数据库,因此我们首先选择 LCO1490 与 HCO2198 (Folmer *et al.*, 1994)为 COI 基因的引物。在其他线粒体基因中,16S rDNA 也具有较广泛的应用(沈媛等, 2010; Wang *et al.*, 2017),因此我们选择 16S rDNA 作为双重 PCR 的备选基因。考虑到基于 COI 基因的 DNA 条形码长度为 650 bp 左右,我们挑选了 16S rDNA 基因中靶标片段长度分别为 392 bp 和 1 049 bp 的两个片段,并将其分别命名为 *16S-Small* (*16S-S*)和 *16S-Large* (*16S-L*)。与之对应,我们设计了两组双重 PCR 体系,分别用于扩增 *COI + 16S-S* 与 *COI + 16S-L*。实验中所使用的引物见表 2,由金唯智生物科技有限公司合成。

PCR 反应体系: 10 × *TransTaq*-T Buffer 5 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 4 μL, 引物 (10 μmol/L) 各 1 μL, *TransTaq*-T Polymerase (5 U/μL) 1 μL, 模板 2 μL (阴性对照为 2 μL 无菌水),最后以 ddH_2O 补充至 50 μL。PCR 反应程序: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 50℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 40 s, 35 个循环; 72℃ 再延伸 7 min。最后将 PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶中电泳,经 EB 染色观察后,按照 *EasyPure* Quick Gel Extraction Kit (北京全式金生物技术有限公司)说明书回收对应片段,并送至金唯智生物科技有限公司进行测序。

表 1　基于 COI 和 16S rDNA 序列的 14 个节肢动物种的分子鉴定结果

Table 1　Molecular identifications of 14 arthropod species based on COI and 16S rDNA sequences

纲 Class	目 Order	科 Family	标本编号 Specimen no.	GenBank 登录号 GenBank accession no.		基因比对结果（GenBank 登录号；一致性） Blast results（GenBank accession no.; identity）			鉴定结果 Identification results
				COI	*16S-L*	*COI*	*16S-L*	*16S-S*	
昆虫纲 Insecta	双翅目 Diptera	果蝇科 Drosophilidae	1	MN585202	MN619612	*Drosophila melanogaster*（NC_024511；99.85%）	*D. melanogaster*（KY559387；100%）	*D. melanogaster*（NC_024511；100%）	黑腹果蝇 *D. melanogaster*
		蝇科 Muscidae	2	MN585203	MN619613	*Musca domestica*（MG384732；100%） *Dasyhippus barbipes*（NC_041412；100%）	*M. domestica*（KT444442；99.40%） *D. barbipes*（NC_041412；99.30%）	*M. domestica*（KT444442；98.86%） *D. barbipes*（NC_041412；98.86%）	家蝇 *M. domestica*
	鞘翅目 Coleoptera	拟步甲科 Tenebrionidae	3	MN585204	MN619614	*Tenebrio molitor*（MK088482；100%）	*T. molitor*（MK088482；99.90%）	*T. molitor*（MK088482；100%）	黄粉虫 *T. molitor*
		天牛科 Cerambycidae	4	MN585205	MN619615	*Anoplophora glabripennis*（KY357652；99.85%）	*A. glabripennis*（DQ768215；99.85%）	*A. glabripennis*（HM034776；99.15%）	光肩星天牛 *A. glabripennis*
	膜翅目 Hymenoptera	蜜蜂科 Apidae	5	MN585206	MN619616	*Apis mellifera*（AP018435；99.70%）	*A. mellifera*（AP018432；99.58%）	*A. mellifera*（AP018432；100%）	西方蜜蜂 *A. mellifera*
		蚁科 Formicidae	6	MN585207	MN619617	*Camponotus japonicus*（LT977358；99.70%）	*C. japonicus*（AB371072；98.77%）	*C. japonicus*（AB371072；99.71%）	日本弓背蚁 *C. japonicus*
	直翅目 Orthoptera	斑腿蝗科 Catantopidae	7	MN585208	MN619618	*Chrysochus chinensis*（KU188479；99.54%） *Shirakiacris shirakii*（KC542807；99.39%）	*S. shirakii*（KC542807；99.36%）	*S. shirakii*（KC542807；99.71%）	长翅素木蝗 *S. shirakii*
		驼螽科 Rhaphidophoridae	8	MN585209	MN619619	*Diestrammena asynamora*（KX057726；96.70%）	*D. asynamora*（KX057726；99.69%）	*D. asynamora*（KX057726；100%）	突灶螽 *D. asynamora*
	鳞翅目 Lepidoptera	夜蛾科 Noctuidae	9	MN585210	MN619620	*Spodoptera exigua*（KX862078；100%）	*S. exigua*（JX316220；98.05%）	*S. exigua*（HQ178296；98.86%）	甜菜夜蛾 *S. exigua*
		蝙蝠蛾科 Hepialidae	10	MN585211	MN619621	*Hepialus xiaojinensis*（KP772242；99.24%）	*H. xiaojinensis*（KT834973；99.66%）	*H. xiaojinensis*（KT834973；100%）	小金蝙蝠蛾 *H. xiaojinensis*
	半翅目 Hemiptera	蚜科 Aphididae	11	MN585212	MN619622	*Chaitophorus populeti*（KX680325；100%）	*C. populicola*（AF275233；95.48%）	*C. saliapterus*（KX631485；96.59%）	白杨毛蚜 *C. populeti*
		网蝽科 Tingidae	12	MN585213	MN623864	*Corythucha ciliata*（KM022819；99.54%）	*C. ciliata*（KC756280；99.89%）	*C. ciliata*（KC756280；99.72%）	悬铃木方翅网蝽 *C. ciliata*
甲壳纲 Crustacea	双甲目 Diplostraca	溞科 Daphniidae	13	MN585214	MN619623	*Daphnia magna*（MH683667；98.78%）	*D. magna*（LS991503；100%）	*D. magna*（LS991503；100%）	大型溞 *D. magna*
多足纲 Myriapoda	蚰蜒目 Scutigeromorpha	蚰蜒科 Scutigeridae	14	MN585215	MN619624	*Thereuonema turkestana*（FJ660840；90.55%）	*T. turkestana*（DQ222158；93.85%）	*T. turkestana*（DQ222158；93.81%）	Scutigeridae sp.

表 2 本研究中使用的引物
Table 2 Primers used in this study

基因 Genes	引物 Primers	引物序列(5′-3′) Primer sequences	Tm (℃)	靶标片段长度(bp)* Target fragment length	参考文献 References
COI	LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	54.0	709	Folmer *et al*., 1994
	HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	56.0		
16S-S	16S-F	TRACTGTRCAAAGGTAGC	50.0	392	Schulmeister, 2003
	16S-R	TTAATTCAACATCGAGGTC	52.0		
16S-L	J12888	CCGGTCTGAACTCARATCATGTA	57.5	1 049	Simon *et al*., 2006
	N13889	ATTTATTGTACCTTKTGTATCAG	50.4		

16S-S 和 *16S-L* 分别代表 16S rDNA 中长度为 392 bp 与 1 049 bp 的靶标片段。下同。*16S-S* and *16S-L* represent the 392 and 1 049 bp fragments of 16S rDNA, respectively. The same below. * 以黑腹果蝇线粒体基因组(GenBank 登录号: U37541)为参考序列;靶标片段长度包括引物长度。The mitochondrial genome of *Drosophila melanogaster* (GenBank accession number: U37541) was used as the reference sequence; the target fragment length included the primer length.

1.3 生物信息学分析

1.2 节 PCR 产物测序所得原始序列对齐后,进行人工校对,并将两端残余的引物序列删除,最后获得了每个标本的 *COI*, *16S-S* 以及 *16S-L* 3 条序列,在 GenBank 中使用在线程序 Blastn 搜索每个物种 3 条序列的相似序列。根据 Blast 对比结果(identity 等)以及初步的形态鉴定,将每头标本鉴定至种,或将其认定为尚未公布序列的物种。由于 *16S-S* 位于 *16S-L* 内部,因此,我们仅将每个物种的 *COI* 与 *16S-L* 上传至 NCBI GenBank 数据库中。*COI* 与 *16S-L* 的 GenBank 检索号列于表 1。

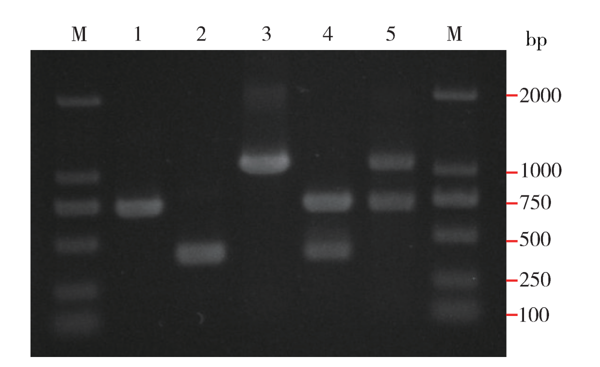


图 1 双重 PCR 应用于黑腹果蝇基因组 DNA 的扩增结果
Fig. 1 Amplification result of *Drosophila melanogaster* genomic DNA with duplex PCR
M: DL2000 DNA marker (TaKaRa); 1: *COI*; 2: *16S-S*; 3: *16S-L*; 4: *COI* + *16S-S*; 5: *COI* + *16S-L*.

2 结果

2.1 通用引物双重 PCR 检测

在致病微生物快速检测中,多重 PCR 的引物通常为特异性引物,以保证多重 PCR 扩增过程中没有非特异扩增条带的产生。在本研究中,为了检测双重 PCR 在较广泛的动物类群中的普适性,基于动物类群中可通用的线粒体通用引物,我们挑选了两组引物用于双重 PCR 实验,其中第 1 组双重 PCR 实验用于扩增 *COI* 与 *16S-S* 两个分子标记,而第 2 组双重 PCR 实验用于扩增 *COI* 与 *16S-L* 两个分子标记(预期扩增获得的各分子标记的靶标序列区域及长度详见方法 1.2 节)。我们首先以果蝇为材料检测了这两组通用引物是否适用于双重 PCR。在以果蝇基因组 DNA 为模板检验双重 PCR 效果的结果中,两组双重 PCR 体系均可以成功扩增靶标片段,并且没有非特异性条带的产生(图 1)。

2.2 多种动物类群的双重 PCR 鉴定

在分属于不同动物类群的 14 个物种的 14 头标本中,两组双重 PCR 实验也可以成功地扩增靶标片段,并没有明显的非特异性条带的产生(图 2)。接下来,将 14 个物种的 *COI*, *16S-L* 以及 *16S-S* 序列预期长度对应的电泳条带分别进行切胶回收并测序,进而将测序结果在 GenBank 进行在线比对。*COI*, *16S-L* 以及 *16S-S* 序列的在线比对和物种鉴定结果(表 1)可以总结为以下 4 类:

(1)可通过线粒体 COI 基因和 16S rDNA 分子标记有效鉴定至已知物种(序列一致性 ≥ 98%)。包括其 9 头标本(标本 1, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 12 和 13),其 *COI*, *16S-L* 以及 *16S-S* 序列可以分别鉴定至同一物种,并且具有较高的可信度,这些标本的鉴定结果分别为:黑腹果蝇 *D. melanogaster*,黄粉虫 *T. molitor*,光肩星天牛 *A. glabripennis*,西方蜜蜂 *Apis mellifera*,日本弓背蚁 *Camponotus japonicus*,甜菜夜蛾 *S. exigua*,小金蝙蝠蛾 *H. xiaojinensis*,悬铃木方翅网蝽 *Corythucha ciliata* 以及大型溞 *D. magna*。

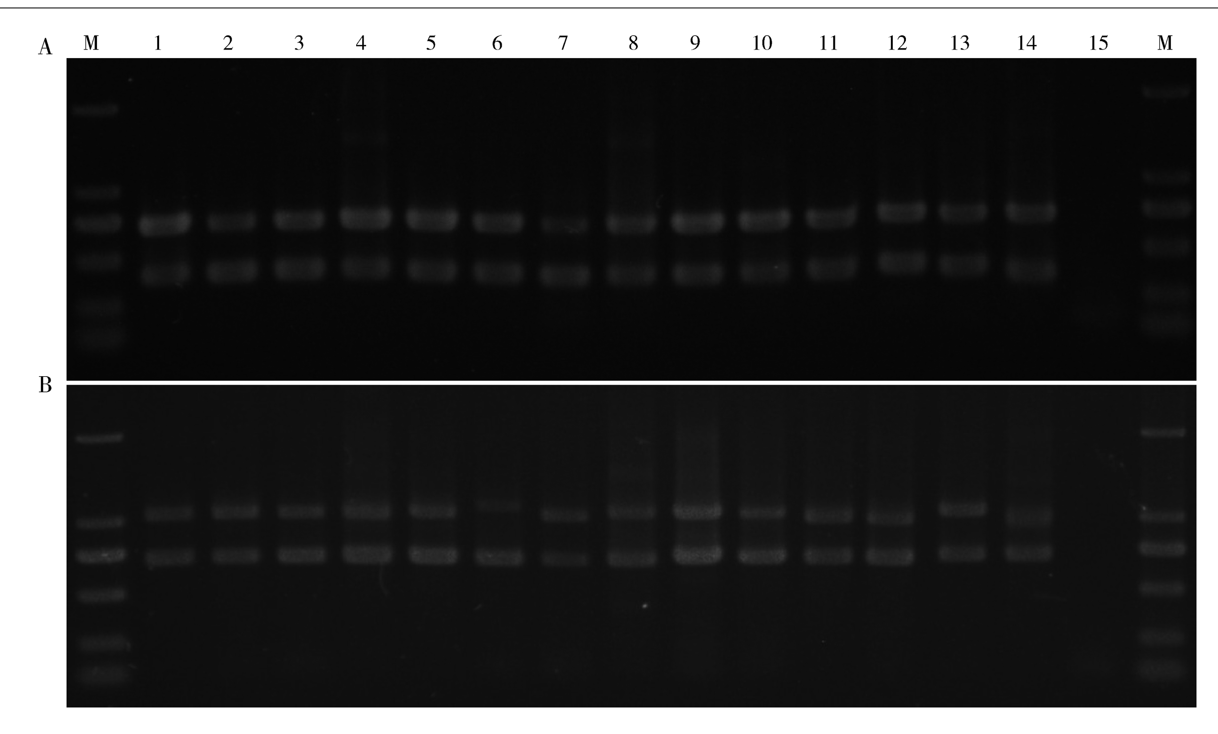


图 2　14 个节肢动物种的两组双重 PCR 扩增结果

Fig. 2　Amplification results of two sets of duplex PCR in 14 arthropod species

A：*COI* + *16S-S* 的双重 PCR 结果 Duplex PCR result of *COI* + *16S-S*；B：*COI* + *16S-L* 的双重 PCR 结果 Duplex PCR result of *COI* + *16S-L*. M：DL2000 DNA marker（TaKaRa）；1：黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*；2：家蝇 *Musca domestica*；3：黄粉虫 *Tenebrio molitor*；4：光肩星天牛 *Anoplophora glabripennis*；5：西方蜜蜂 *Apis mellifera*；6：日本弓背蚁 *Camponotus japonicus*；7：长翅素木蝗 *Shirakiacris shirakii*；8：突灶螽 *Diestrammena asynamora*；9：甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*；10：小金蝙蝠蛾 *Hepialus xiaojinensis*；11：白杨毛蚜 *Chaitophorus populeti*；12：悬铃木方翅网蝽 *Corythucha ciliata*；13：大型溞 *Daphnia magna*；14：Scutigeridae sp.；15：阴性对照 Negative control（ddH_2O）.

（2）*COI* 和（或）*16S-L*，*16S-S* 序列与参考序列一致性略低于 98%，但仍可鉴定至已知物种。包括 2 头标本：直翅目标本 8 的 *COI*，*16S-L* 以及 *16S-S* 序列均可以比对至突灶螽的序列，并且与已知序列的一致性分别为 96.70%，99.69% 和 100%，因此标本 8 的鉴定结果为突灶螽；半翅目标本 11 的 *COI*，*16S-L* 以及 *16S-S* 序列分别比对至白杨毛蚜 *Chaitophorus populeti*，*C. populicola* 和 *C. saliapterus*，序列一致性为分别为 100%，95.48% 和 96.59%，因此标本 11 的鉴定结果为白杨毛蚜。

（3）通过 *COI* 和（或）16S rDNA 不能有效鉴定至特定已知物种，可能为新种，或该物种的相关序列尚未公布。仅涉及 1 头标本，即蚰蜒目标本 14，其 *COI*，*16S-L* 以及 *16S-S* 序列均比对至 *Thereuonema turkestana*，但与已知序列一致性分别为 90.55%，93.85% 和 93.81%，因此该标本不能成功鉴定至种，在本文中标记为 Scutigeridae sp.。

（4）*COI* 和（或）16S rDNA 序列分别可以比对至两个已知物种。包括另有 2 头标本：双翅目标本 2 的 *COI*，*16S-L* 以及 *16S-S* 序列均可以比对至家蝇 *M. domestica* 和毛足棒角蝗 *Dasyhippus barbipes*，并且一致性 > 98%；直翅目标本 7 的 *COI* 序列可以比对至长翅素木蝗 *Shirakiacris shirakii* 和中华萝藦肖叶甲 *Chrysochus chinensis*，*16S-L* 以及 *16S-S* 序列可以比对至长翅素木蝗 *S. shirakii*。虽然标本 2 与标本 7 的基因比对结果中分别出现了两个物种，但在实验前，我们首先根据形态特征，将不同标本划分至科，因此我们确信标本 2 和标本 7 的鉴定结果分别为家蝇和长翅素木蝗。

3　讨论与结论

目前多重 PCR 广泛应用于致病微生物检测（郝少东等，2015；Kim *et al.*，2015）中；此外也有研究者应用多重 PCR 来扩增基因组（Quick *et al.*，2017；孙嘉仪等，2017）。在这些研究中，多重 PCR 所需引物均需要根据已知序列设计特异性引物。在本研究中，我们使用线粒体基因通用引物来检测在不同动物类群中通过多重 PCR 技术同时获取多条靶标片段的可行性。我们首先考虑双重 PCR 的可行性，

通过双重 PCR 产物的电泳图,我们可以发现基于通用引物的双重 PCR 技术可以可靠地扩增出目的条带,并没有非靶标条带的产生。本研究中,我们选取的靶标片段为线粒体 COI 基因和 16S rDNA,并且 *16S-L* 和 *16S-S* 两个片段具有相似的物种鉴别能力。

引物的选择与优化被认为是影响多重 PCR 效果最大的因素(Elnifro *et al*., 2000)。在本研究中,我们选取了线粒体基因 *COI* 与 16S rDNA 作为靶标基因,因此我们不得不考虑本研究中挑选的两对引物,在扩增过程中是否存在相互影响。首先,我们考虑了两个基因的位置关系。由于大多数昆虫线粒体基因组排列与昆虫线粒体基因组原始排列顺序一致(陈志腾和杜予州, 2016),以黑腹果蝇线粒体基因组(U37541)为例,*COI* 与 *16S-L* 两个标记基因片段之间的间距达到 7 120 bp 和 10 641 bp;而本研究中所使用的 DNA 聚合酶 *TransTaq*-T Polymerase 的扩增速度为 1 ~ 2 kb/min, PCR 过程中延伸时间为 40 s,这就意味着如果实验物种没有发生线粒体基因重排事件,两个片段的引物是不会发生相互干扰的。其次,我们对比了引物之间的互补关系,并未发现相互之间有互补结构的出现。本研究中,*COI* 片段在两组双重 PCR 体系的扩增中均获得了较明亮的条带,而部分 16S rDNA 片段的条带较暗,例如日本弓背蚁的 *16S-L* 片段,这可能与引物的熔解温度或扩增产物片段大小相关;但 50 μL 的双重 PCR 体系,使我们可以通过胶回收获取足量的 *16S-L* 片段,满足测序的要求。另外,针对多重 PCR 体系中部分产物较弱的问题,在多重 PCR 体系中增加对应引物的量,增加引物与模板匹配的概率,也被认为解决问题的有效方法(Elnifro *et al*., 2000; 郝少东等, 2015)。鉴于目前有大量针对线粒体基因组设计的通用引物,其中有的是针对动物界(Simon *et al*., 1994, 2006),有的针对某一类群(张乃心等, 2013),这些引物完全可以供我们在研究不同类群时,挑选不同的基因,尝试不同的组合,开展用双重或多重 PCR 策略进行物种鉴定的工作。

本研究中,我们比较了双重 PCR 法与常规方法在操作流程中的差异,两种方法的最明显差异体现在消耗的时间及样本量中:采用传统方法扩增两种标记基因所花费的时间以及消耗的 DNA 样品,均是双重 PCR 方法的两倍;而如果后期我们可以用通过引物设计、体系优化等方法实现多重 PCR,即在一个反应体系内同时扩增 3 个或 3 个以上的标记基因,这种差异会更加明显。而在需要对样品进行快速物种鉴定,或是样本材料十分珍贵的情况下,这两点无疑是非常重要的。

准确而丰富的 DNA 分子序列库对基于 DNA 序列差异分析的物种鉴定工作十分重要。在本研究中,我们发现家蝇与长翅素木蝗这两头标本的线粒体 DNA 分别可以比对至两个物种,甚至部分片段的序列一致性高达 100%。而更令人吃惊的是, GenBank 中已公布的唯一的毛足棒角蝗 *D. barbipes* 的线粒体基因组(GenBank 登录号: NC_041412),与家蝇的线粒体基因组序列一致性高达 99.56% ~ 99.91%,而这些家蝇线粒体基因组测序是由不同作者完成的,因此,我们怀疑毛足棒角蝗 *D. barbipes* 已公布的线粒体基因组 DNA 可能受到了家蝇 DNA 的污染。另外,我们样本中来自多足纲蚰蜒目蚰蜒科的标本 14,其 *COI* 序列和 16S rDNA 序列均未能以高可信度匹配至 GenBank 中的确切物种。这些结果提示我们,在进一步完善 DNA 条形码及其他标记基因数据库的同时,我们务必确保样本没有受到外源污染;此外,在对物种进行分子鉴定之前,我们有必要基于形态学对样本进行初步划分,以便应对上述出现的问题。

基于通用引物的双重 PCR,可以在较广泛的动物类群中,一次性扩增出单一样本的多条标记基因,可以节省大量时间与材料。对于需要快速准确鉴定物种,或材料样本十分珍贵的情况,双重 PCR 是很好的选择。

参考文献(References)

Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT, 1988. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res*., 16(23): 11141 - 11156.

Chen ZT, Du YZ, 2016. Rearrangment of mitochondrial genome in insects. *J. Environ. Entomol*., 38(4): 843 - 851. [陈志腾, 杜予州, 2016. 昆虫线粒体基因组重排的研究进展. 环境昆虫学报, 38(4): 843 - 851]

Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE, 2000. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clin. Microbiol. Rev*., 13(4): 559 - 570.

Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R, 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol*., 3(5): 294 - 299.

Hao SD, Chen YQ, Wang JZ, Wang H, Tao WQ, Zhang ZY, Shi XY, Zhou S, 2015. Multiplex-PCR for indentification of two *Hishimonus* species (Hemiptera: Cicadellidae) in jujube orchards and detection

of jujube witches' broom (JWB) phytoplasma in their bodies. *Acta Entomol. Sin.*, 58(3): 264-270. [郝少东, 陈昱圻, 王进忠, 王合, 陶万强, 张志勇, 石小玉, 周赛, 2015. 多重 PCR 法区分枣园两种菱纹叶蝉及检测其体内枣疯病植原体. 昆虫学报, 58(3): 264-270]

Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR, 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.*, 270(1512): 313-321.

Kim HJ, Ryu JO, Lee SY, Kim ES, Kim HY, 2015. Multiplex PCR for detection of the *Vibrio* genus and five pathogenic *Vibrio* species with primer sets designed using comparative genomics. *BMC Microbiol.*, 15: 239.

Magnacca KN, Brown MJ, 2010. Tissue segregation of mitochondrial haplotypes in heteroplasmic Hawaiian bees: implications for DNA barcoding. *Mol. Ecol. Res.*, 10(1): 60-68.

Potrykus M, Sledz W, Golanowska M, Slawiak M, Binek A, Motyka A, Zoledowska S, Czajkowski R, Lojkowska E, 2014. Simultaneous detection of major blackleg and soft rot bacterial pathogens in potato by multiplex polymerase chain reaction. *Ann. Appl. Biol.*, 165(3): 474-487.

Quick J, Grubaugh ND, Pullan ST, Claro IM, Smith AD, Gangavarapu K, Oliveira G, Robles-Sikisaka R, Rogers TF, Beutler NA, Burton DR, Lewis-Ximenez LL, de Jesus JG, Giovanetti M, Hill SC, Black A, Bedford T, Carroll MW, Nunes M, Alcantara LCJr, Sabino EC, Baylis SA, Faria NR, Loose M, Simpson JT, Pybus OG, Andersen KG, Loman NJ, 2017. Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples. *Nat. Protoc.*, 12(6): 1261-1276.

Ratnasingham S, Hebert PD, 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Mol. Ecol. Notes*, 7(3): 355-364.

Schulmeister S, 2003. Simultaneous analysis of basal Hymenoptera (Insecta): introducing robust-choice sensitivity analysis. *Biol. J. Linn. Soc.*, 79(2): 245-275.

Shen Y, Du YZ, Jin GH, Xue BL, Zheng FS, Ren SX, 2010. Phylogenetic analysis of *Bemisia bataci* non-B biotypes in partial areas in China based on 16S rDNA gene. *Acta Entomol. Sin.*, 53(1): 82-90. [沈媛, 杜予州, 金桂华, 薛宝利, 郑福山, 任顺祥, 2010. 基于 16S rDNA 基因的中国部分地区非 B 型烟粉虱系统发育关系分析. 昆虫学报, 53(1): 82-90]

Simon C, Buckley TR, Frati F, Stewart JB, Beckenbach AT, 2006. Incorporating molecular evolution into phylogenetic analysis, and a new compilation of conserved polymerase chain reaction primers for animal mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 37: 545-579.

Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P, 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 87(6): 651-701.

Song H, Buhay JE, Whiting MF, Crandall KA, 2008. Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105(36): 13486-13491.

Sun JY, Yang C, Hu XW, Zhang J, Zhou DZ, He L, Wan CL, 2017. A cost-efficient method for sequencing the human whole mitochondrial genome utilizing multiplex PCR-based next generation sequencing. *Sci. Sin. Vit.*, 47(4): 396-402. [孙嘉仪, 杨超, 胡晓雯, 张娟, 周代占, 贺林, 万春玲, 2017. 一种基于多重 PCR 的人类线粒体基因组高通量测序方法. 中国科学: 生命科学, 47(4): 396-402]

Sun XJ, Xiao JH, Cook JM, Feng G, Huang DW, 2011. Comparisons of host mitochondrial, nuclear and endosymbiont bacterial genes reveal cryptic fig wasp species and the effects of *Wolbachia* on host mtDNA evolution and diversity. *BMC Evol. Biol.*, 11: 86.

Wang ZL, Yang XQ, Wang TZ, Yu X, 2017. Assessing the effectiveness of mitochondrial COI and 16S rRNA genes for DNA barcoding of farmland spiders in China. *Mitochondrial DNA A DNA Map. Seq. Anal.*, 29(5): 695-702.

Xiao JH, Wang NX, Murphy RW, Cook J, Jia LY, Huang DW, 2012. *Wolbachia* infection and dramatic intraspecific mitochondrial DNA divergence in a fig wasp. *Evolution*, 66(6): 1907-1916.

Zhang NX, Zhang YJ, Yu G, Chen B, 2013. Structure characteristics of the mitochondrial genomes of Diptera and design and application of universal primers for their sequencing. *Acta Entomol. Sin.*, 56(4): 398-407. [张乃心, 张玉娟, 余果, 陈斌, 2013. 双翅目昆虫线粒体基因组结构特点及其测序通用引物的设计和应用. 昆虫学报, 56(4): 398-407]

（责任编辑：马丽萍）